

枯草芽孢杆菌突变体在合成培养基中的生长和肌苷合成的研究

王敖全 李敏 程光胜

(中国科学院微生物研究所, 北京)

用枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)产肌苷突变体 24-36, 在合成培养基中探讨了核酸碱基等成份对肌苷积聚的影响, 结果表明: 1. 在所试验的 7 种碱基中, 腺嘌呤对肌苷积聚影响最大, 它的最适含量为 200 毫克/升, 超过 400 毫克/升时肌苷积聚显著降低, 但生长量达到最大值。2. 在腺嘌呤含量为 200 毫克/升的培养基中加入适量尿嘧啶能促进菌体生长和肌苷积聚。3. 在腺嘌呤过量存在时, 加入 0.3% 次黄嘌呤, 肌苷积聚量可达最适腺嘌呤时的合成量。4. 硫胺素营养缺陷型与其自发回复突变株积聚肌苷的能力无明显区别。5. 葡萄糖, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 尿素。L-谷氨酸对该菌生长和肌苷积聚均有一定影响, 但以 L-谷氨酸在培养基中的含量影响最大。

我们曾报道了肌苷产生菌枯草芽孢杆菌 B₅ 突变体的选育和发酵条件^[1]。为进一步阐明肌苷发酵培养基中各种化学成份对肌苷产生菌株的生长和肌苷合成的影响, 找到肌苷合成的适合条件, 我们在合成培养基中对一株肌苷产生菌枯草芽孢杆菌突变体 24-36 进行了研究。

材料和方法

(一) 受试菌株

一株需腺嘌呤、硫胺素和 L-组氨酸的突变体 24-36。它和 B₅ 都得自 18-12 (ade⁻ thi⁻)。其选育程序见图 1。

(二) 种子悬浮液的制备

种子培养液组成(%)：酵母膏 1, 蛋白胨 1, NaCl 0.5。灭菌前调 pH7.0, 煮沸后用粗滤纸过滤。200 毫升三角瓶装液 20 毫升。110°C 30 分钟灭菌。从斜面接一环受试菌于种子培养液, 置旋转摇床 (200 次/分) 34°C 振荡培养 15—16 小时, 离心, 用生理盐水洗涤菌体 2 次, 再悬浮于生理盐水中。控制菌体浊度在光密度 0.80—0.90 (660 毫微米) 待用。

(三) 肌苷发酵试验

发酵培养基组成见实验结果。灭菌前调 pH 7.0, 500 毫升三角瓶装液 25 毫升, 110°C 灭菌 10 分钟。每瓶接入上述种子悬浮液 0.2 毫升, 此时发酵液光密度接近于 0, 活细胞数大约 10^6 — 10^7 个/毫升。34°C 旋转摇床 (200 次/分) 培养 96 小时。

(四) 细胞生长数量的测定

将发酵液稀释 10 倍, 于 72 型分光光度计上, 在波长 660 毫微米, 光程 0.5 厘米测定光密度, 以其读数示菌体生长量。肌苷、次黄嘌呤测定同前报^[1]。尿嘧啶核苷测定, 除用波长 260 毫微米外, 其余同肌苷测定。

结果和讨论

(一) 碱基对突变体 24-36 的生长和肌苷合成的影响

在肌苷发酵生产过程中, 发酵培养基中酵母是一种必需原料, 它的来源及其用量不同会极大地影响肌苷的产量^[1]。已知酵母粉中含有丰富的核糖核酸及其降解产

本文于 1976 年 10 月 22 日收到。

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) AS 1.377 (野生型)

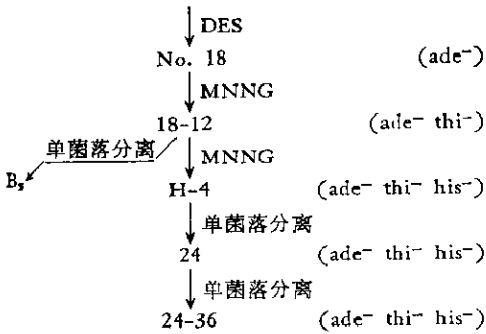


图 1 肌苷产生菌枯草芽孢杆菌突变体 24-36 的选育程序

物。为了弄清通过酵母粉提供的各种碱基对肌苷产生菌株的生长和肌苷合成的影响,我们试验了腺嘌呤等 7 种碱基。试验浓度均为 300 毫克/升。从试验结果(表 1)

可以看到,嘧啶碱基对 24-36 突变体的生长和肌苷合成没有明显影响。Yamanoi A.^[3] 等曾报道尿嘧啶对枯草芽孢杆菌肌苷产生菌的肌苷合成有抑制作用,并认为是由于尿嘧啶抑制了该菌株生长的结果。在我们的实验条件下则没有观察到这一现象。相反,当加入的尿嘧啶量达到一定浓度(10 毫克分子以上)时还能明显地提高肌苷的积聚量(图 4)。嘌呤碱基的作用有所不同,加入过量的腺嘌呤强烈地阻碍了肌苷的形成。有些研究者证明,这是由于嘌呤代谢的末端产物腺嘌呤核苷酸和鸟嘌呤核苷酸对肌苷生物合成酶类的反馈抑制和阻遏所致^[4]。除次黄嘌呤外,鸟嘌呤和黄嘌呤都在一定程度上影响了肌苷的形成。

表 1 碱基对突变体 24-36 的生长和肌苷合成的影响

碱 基	含量(毫克/升)	终 pH	菌生长(光密度)	残糖(%)	肌苷(克/升)
对照(腺嘌呤)	200	5.8	0.35	3.0	2.80
腺嘌呤	400	5.4	0.69	2.1	0.78
胸腺嘧啶	300	6.4	0.32	2.7	2.26
胞嘧啶	300	5.8	0.42	3.0	2.54
尿嘧啶	300	5.4	0.40	1.5	2.82
鸟嘌呤	300	6.4	0.40	0.8	1.16
次黄嘌呤	300	6.0	0.40	4.0	2.98
黄嘌呤	300	6.7	0.34	2.9	1.83

注: 发酵培养基组成(%)为: 葡萄糖 8, (NH₄)₂SO₄ 1.5, L-谷氨酸 0.40, 尿素 0.20, KCl 0.15, KH₂PO₄ 0.20, MgSO₄·7H₂O 0.04, FeSO₄·7H₂O 0.001, MnSO₄·nH₂O 0.001, L-组氨酸 0.02, 腺嘌呤 0.02, 硫胺素 0.0003。

(二) 腺嘌呤含量对 24-36 突变体的生长和肌苷形成的影响

试验结果(图 2)表明,培养基中腺嘌呤含量显著地左右着肌苷的积聚。当培养基中腺嘌呤为 200 毫克/升时,肌苷积聚量达最大值,当腺嘌呤含量在 300 毫克/升以上时,肌苷形成显著降低。对突变体 24-36 的生长而言,达到最大生长量的腺嘌呤含量为 400 毫克/升。因此,为有利于肌苷大量形成,培养基中的腺嘌呤以须采用“亚适量”为宜。

(三) 腺嘌呤过量存在时碱基对突变体 24-36 的生长和肌苷合成的影响

从图 2 可知,在腺嘌呤过量时会使肌苷积聚显著减少,此时各种碱基对肌苷形成将有何影响呢? 试验结果(表 2)表明,在腺嘌呤过量存在时,加入的嘧啶碱基除尿嘧啶外,使肌苷积聚量比对照略高。而嘌呤碱基除次黄嘌呤外均比对照略低。后一情况与表 1 的结果是一致的。有趣的是,加入的次黄嘌呤使突变体 24-36 的肌苷积聚量几乎达到了腺嘌呤“亚适量”时的

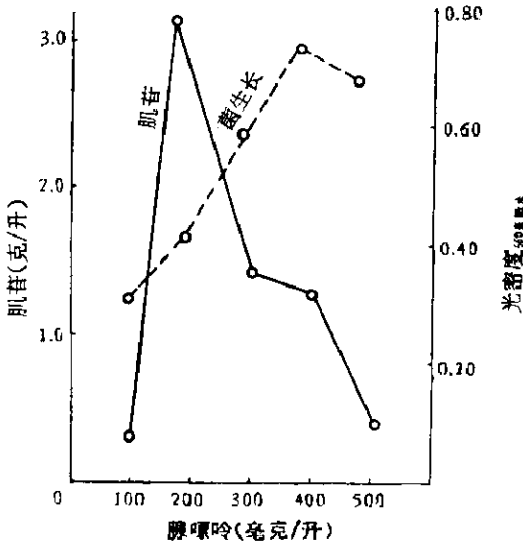


图2 腺嘌呤含量对突变体 24-36 的生长和肌苷合成的影响
注：发酵培养基组成除腺嘌呤按图加入外，其余同表 1。

水平。可能的解释是，由于枯草芽孢杆菌肌苷产生菌 24-36 存在由次黄嘌呤→肌苷的分段合成途径，而分段合成不受腺嘌呤的调节。但这一解释还不能满意，因为假设加入的次黄嘌呤完全分段合成为肌苷，也不能使肌苷积聚达腺嘌呤“亚适量”时的水平。是否次黄嘌呤能解除腺嘌呤对肌苷形成的阻抑作用，有待进一步研究。

(四) 硫胺素对 24-36 突变体的生长和肌苷合成的影响

1. 24-36 突变体与其硫胺素营养缺陷自发回复突变株产肌苷的比较。

从 24-36 突变体的选育中，我们发现，腺嘌呤营养缺陷型 No18 几乎不积聚肌苷，但经 1 次亚硝基胍诱变获得的腺嘌呤、硫胺素、双重营养缺陷型突变体 18-12，积聚

表 2 腺嘌呤过量存在时碱基对 24-36 突变体的生长和肌苷形成的影响

碱基	含量(毫克/升)	终 pH	菌生长(光密度)	残糖(%)	肌苷(克/升)
腺嘌呤	200(亚适量)	5.8	0.34	2.8	2.74
腺嘌呤	400(对照)	5.4	0.63	2.3	1.01
胸腺嘧啶	300	6.4	0.53	2.6	1.66
胞嘧啶	300	5.4	0.62	2.8	1.36
尿嘧啶	300	6.0	0.61	2.0	0.76
鸟嘌呤	300	5.8	0.67	2.5	0.90
次黄嘌呤	300	5.4	0.62	1.5	2.50
黄嘌呤	300	6.4	0.55	2.2	0.85

注：发酵培养基组成除腺嘌呤含量为 400 毫克/升外，其余同表 1。

肌苷能力大大增加（在天然培养基中产肌苷 8 克/升以上）。这是否意味着硫胺素生物合成的遗传障碍与肌苷的积聚有关呢？为研究这一问题，我们从 24-36 获得了几株 thi⁻ 的自发回复突变株，并测定了它们的肌苷产量。从结果（表 3）可以看出，所试验的 4 株硫胺素营养缺陷型自发回复突变体的肌苷产量与 24-36 突变体没有区别。

2. 硫胺素含量对 24-36 突变体的生长和肌苷合成的影响。

如图 3 所示，硫胺素对 24-36 和 24-36

表 3 硫胺素营养缺陷株与其回复突变体的肌苷产量的比较

菌株	遗传标记	终 pH	菌生长(光密度)	肌苷(克/升)
24-36	ade ⁻ his ⁻ thi ⁻	5.4	0.41	2.67
thi ⁺ -1	ade ⁻ his ⁻ thi ⁺	5.4	0.42	2.26
thi ⁺ -2	”	5.4	0.41	2.90
thi ⁺ -3	”	5.4	0.42	2.87
thi ⁺ -4	”	5.4	0.44	2.87

注：培养基组成同表 1。

硫胺素营养缺陷自发回复突变体 thi⁺-3 的生长和肌苷形成有一定影响，但并不显著。

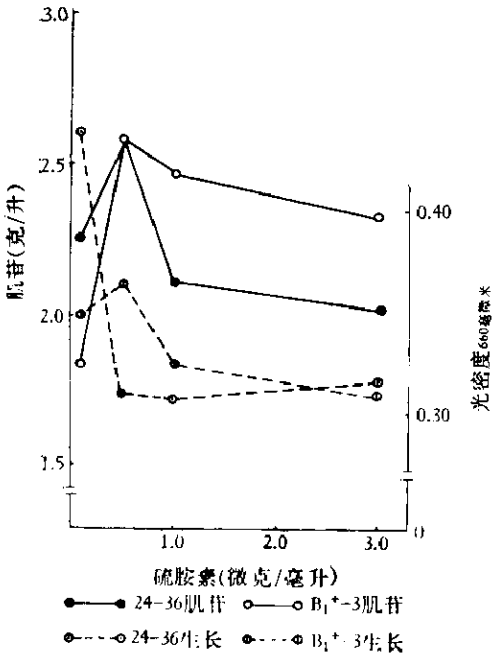


图3 硫胺素含量对24-36突变体和thi⁺-3的生长和肌苷形成的影响
注：培养基组成除硫胺素用量按图加入外，其余同表1。

(五) 尿嘧啶的含量对24-36突变体尿苷分段合成及肌苷合成的影响

我们曾报道过枯草芽孢杆菌肌苷产生菌B₅能由次黄嘌呤分段合成肌苷^[1]，在试验各种碱基对肌苷合成的影响时，发现加入尿嘧啶的发酵液在层析谱上出现四个紫外吸收斑点，经与标准样品比较Rf值，以及不同pH时的紫外吸收峰，证明它们分别是尿苷、尿嘧啶、肌苷和次黄嘌呤。进而对24-36突变体分段合成尿苷的能力作了试验。结果(见图4)表明，外源添加的尿嘧啶不仅被分段合成为尿苷，而且加入的尿嘧啶还显著地提高了肌苷的积聚量。当加入的尿嘧啶为20毫克分子时，使肌苷积聚量比对照几乎提高1倍。这一事实意味着嘌呤与嘧啶在代谢上存在着十分密切的关系。

(六) KH₂PO₄ 和 MgSO₄·7H₂O 对24-36突变体的生长和肌苷合成的影响

图5图6结果表明，对于肌苷产生菌

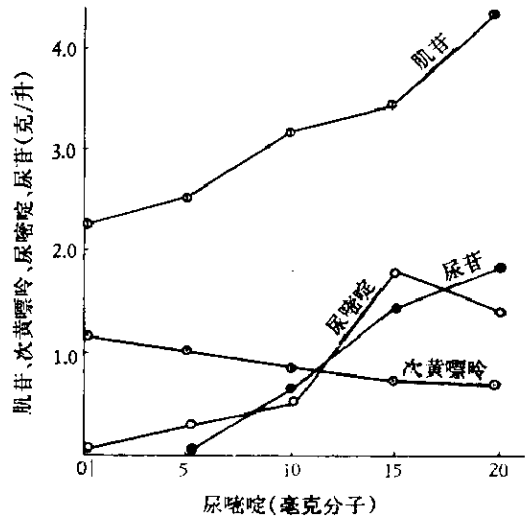


图4 尿嘧啶含量对24-36尿苷分段合成和肌苷合成的影响
注：发酵培养基中除硫胺素为0.5微克/毫升外，其余同表1。

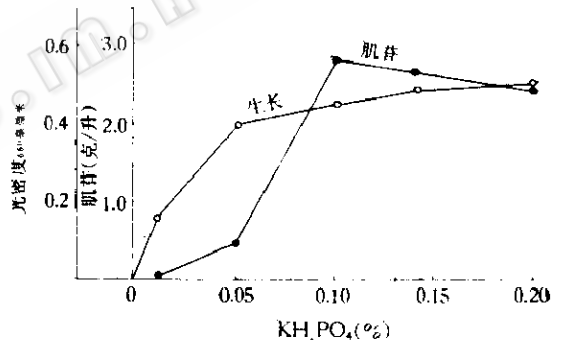


图5 KH₂PO₄含量对24-36突变体的生长和肌苷合成的影响
注：发酵培养基中除KH₂PO₄含量按图外，其余同图4。

24-36突变体的生长和最大的肌苷合成需要一定量KH₂PO₄和MgSO₄·7H₂O，前者为0.10%，后者为0.04%。进一步增加它们的浓度，对生长和肌苷合成均无明显影响。

(七) 葡萄糖、(NH₄)₂SO₄、尿素、L-谷氨酸与肌苷合成的关系

在肌苷发酵中，选择适合的碳源和氮源，并找出它们的适宜用量是重要的。我们应用正交试验表安排试验，对葡萄糖、(NH₄)₂SO₄、尿素、L-谷氨酸与肌苷合成的

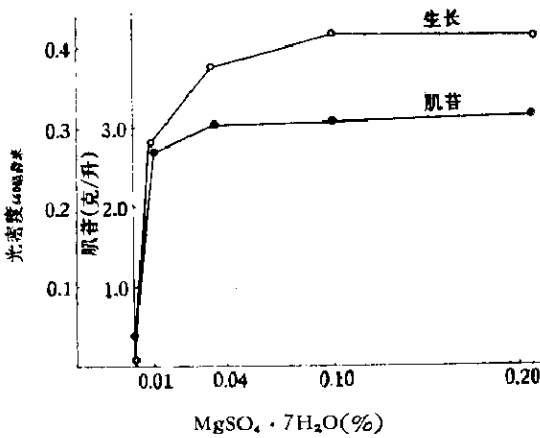


图6 MgSO₄·7H₂O 对 24-36 突变体的生长和肌苷合成的影响

注: 发酵培养基组成除 MgSO₄·7H₂O 含量按图外,其余同图 4。

关系作了研究。试验采用 4 个因素、4 个

水平(见表 4), 选用了 L₁₆(4)⁵ 正交表。实验结果见表 5。

根据实验结果作出因素与指标(肌苷产量)关系图(图 7), 结果表明, 葡萄糖、(NH₄)₂SO₄、尿素、L-谷氨酸的适宜用量分别为 8—10%、1.0—2.5%、0.20%、0.40%。从试验结果还可以看出四个因素中以 L-谷氨酸影响为最大。

表 4 试验的因素和水平

因素	葡萄糖 (%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	尿素 (%)	L-谷氨酸 (%)
位级 1	6	1.0	0.10	0.20
位级 2	8	1.5	0.20	0.30
位级 3	10	2.0	0.30	0.40
位级 4	12	2.5	0.40	0.60

表 5 正交试验结果

试验号	葡萄糖	(NH ₄) ₂ SO ₄	尿 素	L-谷氨酸	肌苷(克/升)
1	1	2	4	1	0.10
2	3	3	3	1	2.10
3	2	4	3	3	2.78
4	4	1	4	3	1.43
5	1	3	2	3	2.52
6	3	2	1	3	1.97
7	2	1	1	1	1.20
8	4	4	2	1	1.54
9	1	1	3	4	0
10	3	4	4	4	0.63
11	2	3	4	2	0.70
12	4	2	3	2	1.16
13	1	4	1	2	1.40
14	3	1	2	2	1.47
15	2	2	2	4	1.37
16	4	3	1	4	0.13
K ₁	4.02	4.10	4.60	5.13	
K ₂	6.05	4.60	7.09	4.73	
K ₃	6.17	5.45	6.04	8.70	
K ₄	4.26	5.75	2.16	2.13	
K ₁ ⁻	1.00	1.02	1.15	1.28	
K ₂ ⁻	1.51	1.15	1.79	1.20	
K ₃ ⁻	1.53	1.38	1.51	2.19	
K ₄ ⁻	1.06	1.44	0.53	0.50	
R	0.53	0.42	1.28	1.69	

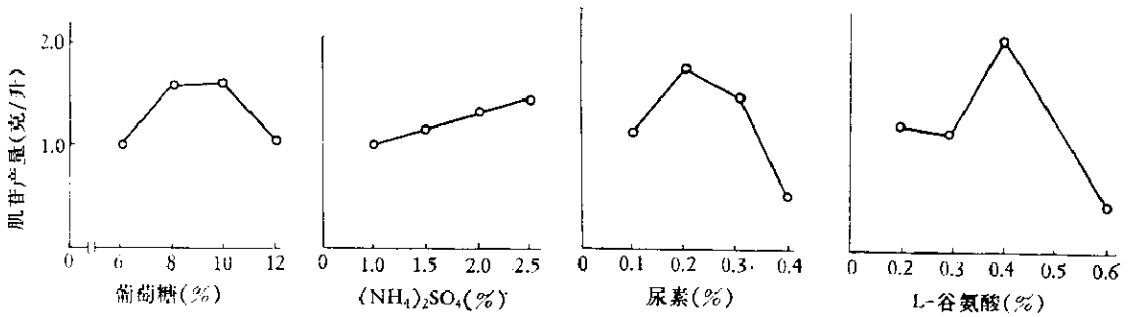


图7 葡萄糖、(NH₄)₂SO₄、尿素、L-谷氨酸与肌苷合成的关系

参 考 资 料

- [1] 王敖全、程光胜、李逢英: 微生物学报, 16 (2): 171—176, 1976年
 [2] 中国科学院微生物研究所肌苷组: 微生物育种学

术讨论文集(研究工作报告), 73—78页, 科学出版社, 1974年。

- [3] Yamanoi A. et al.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 13, 365—380, 1967.
 [4] Sato H. et al.: *J. Biochem.*, 68, 763—773, 1970.

STUDIES ON THE GROWTH AND THE INOSINE SYNTHESIS OF *BACILLUS SUBTILIS* MUTANT GROWN ON A SYNTHETIC MEDIUM

Wang Aoquan, Li Min, Cheng Guangsheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

By using of an inosine producing mutant of *B. subtilis* 24—36 grown on a synthetic medium to observe the effects of the base components of the nucleic acid and other influencing constituent to accumulation of inosine, the following results were obtained.

1. In the seven base components tested adenine influenced most effectively on the accumulation of inosine, the optimal quantity was 200 mg/l, beyond 400 mg/l in medium containing the accumulation of inosine damaged remarkably.

2. At the level of adenine 200 mg/l, the addition of an adequate amount of uricil promoted the biomass yield of the bacteria tested and the accumulation of the inosine.

3. Adding 300 mg/l of hypoxanthine to the medium containing excess amount of adenine, the accumulation of inosine reached to the same level as the optimal amount of adenine containing medium obtained.

4. No significant difference of the inosine accumulation capacity between the thiamine deficiency strain and its spontaneous reversing mutant was observed.

5. As the constituents of the culture medium, glucose, (NH₄)₂SO₄, urea and L-glutamic acid had certain effects on the growth of the mutant and the inosine accumulation individually, but the effect of L-glutamic acid amount was the most powerful one.